论著

文章编号:1000-5404(2011)19-2008-04

三羟基异黄酮联合放疗对人肺腺癌细胞增殖凋亡的影响

周 芊[1],李少林[1],杨镇洲[2],王 东[2],李梦侠[2],曾林立[2] (400016 重庆,重庆医科大学基础医学院核医学教研室[1];400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所肿瘤中心[2])

[摘要] **目的** 观察三羟基异黄酮(Genistein)联合放疗对人肺腺癌细胞 A549 增殖凋亡及其 Ape1/Ref1 蛋白的影响。**方法** 1组单用0、10、30、60、90 μmol/L 的 Genistein 处理 A549 细胞 48 h,另1组用同样浓度的 Genistein 预处理 24 h 后予以直线加速器放疗 8 Gy,继续培养 24 h 后用噻唑蓝比色法(MTT)检测各组活细胞数,确定最适 Genistein 联合放疗的浓度。用流式细胞仪检测对照组、单纯放疗组(IR 8 Gy)、单纯 Genistein 组(GEN 30 μmol/L)、Genistein + IR 组(GEN 30 μmol/L + IR 8 Gy)的细胞凋亡;采用 Western blot 法检测各组细胞中 Ape1/Ref1 蛋白表达。**结果** 30、60、90 μmol/L 的 Genistein 联合放疗比单用相应浓度的 Genistein 处理细胞增殖抑制率高($P<0.05$),但低浓度 10 μmol/L 联合放疗与单纯放疗比较差异不明显[(26.67 ± 1.26)% *vs* (24.70 ± 0.72)%, $P=0.102$]。IR 组、Genistein + IR 组早期凋亡率较对照组明显增高[(30.88 ± 7.63)%、(42.98 ± 1.46)% *vs* (6.80 ± 0.98)%, $P<0.05$],加药组较对照组无明显统计学差异[(12.96 ± 4.99)% *vs* (6.80 ± 0.98)%, $P=0.143$];与对照组、单纯放疗组、单纯加药组比,Genistein + IR 组中 Ape1/Ref1 的表达明显下调。**结论** 三羟基异黄酮可增加放疗对 A549 细胞的增殖抑制作用,可能与减少 Ape1/Ref1 蛋白的表达有关。

[关键词] 三羟基异黄酮;人肺腺癌 A549 细胞; Ape1/Ref1 蛋白表达

[中图法分类号] R73-36; R730.23; R734.2 [文献标志码] A

Effect of Genistein combined with radiotherapy on cell proliferation and apoptosis in pulmonary adenocarci noma A549 cells

Zhou Qian[1], Li Shaolin[1], Yang Zhenzhou[2], Wang Dong[2], Li Mengxia[2], Zeng Linli[2] ([1]Department of Nuclear Medicine, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2]Department of Oncology, Institute of Surgory Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042, China)

[**Abstract**] **Objective** To examine the effect of Genistein combined with radiotherapy on the proliferation, apoptosis and Ape1/Ref1 protein expression of human pulmonary adenocarcinoma cell line A549. **Methods** A549 cells were divided into 4 groups including a control group (cells with no treatment), a Genistein group (cells treated with Genistein in the doses of 0 μmol/L, 10 μmol/L, 30 μmol/L, 60 μmol/L and 90 μmol/L, respectively, for 48 h), an IR group (cells treated with a 8 Gy irradiation) and a Genistein + IR group (cells pretreated with the same doses of Genistein for 24 h and with a 8 Gy irradiation by a linear accelerator and continuously cultured for another 24 h). The cell proliferation was examined by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay to determine a most suitable Genistein concentration combined with radiotherapy. Cell apoptosis of the 4 groups was observed by flow cytometry, and Ape1/Ref1 protein expression was measured by Western blotting. **Results** The inhibition rate of cell proliferation was higher in the treatment of 30 μmol/L, 60 μmol/L and 90 μmol/L Genistein combined with irradiation than in the same doses of Genistein treatment alone ($P<0.05$), and the most suitable concentration of Genistein was 30 μmol/L. No significant difference was found between the cells treated with low concentration (10 μmol/L) of Genistein combined with irradiation and with irradiation alone [(26.67 ± 1.26)% *vs* (24.70 ± 0.72)%, $P=0.102$]. The early apoptotic rates of the IR group and the Genistein + IR group were significantly higher than that of the control group [(30.88 ± 7.63)%, (42.98 ± 1.46)% *vs* (6.80 ± 0.98)%, respectively, $P<0.05$], while there was no statistical difference between the control group and the Genistein group [(12.96 ± 4.99)% *vs* (6.80 ± 0.98)%, $P=0.143$]. As compared with the Ape1/Ref1 protein expression of the control group, the IR group and the Genistein group, that of the Genistein + IR group decreased significantly. **Conclusion** Genistein (30 μmol/L)

[基金项目] 国家自然科学基金(30970865);重庆市自然科学基金(CSTC2010BB5030);第三军医大学回国人员启动基金(2009XHG17)

[通信作者] 李少林,电话:(023)68485060,E-mail:shaolinli202@sina.com

can enhance the inhibition effect of radiotherapy on A549 cell proliferation through the reduction of Ape1/Ref1 protein expression.

[**Key words**] Genistein; human pulmonary adenocarcinoma cell; the expression of Ape1/Ref1 protein

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China(30970865), the Natural Science Foundation of Chongqing(CSTC2010BB5030) and the Stating Funds for Personnel Returning From Overseas of Third Military Medical University(2009XHG17). Corresponding author: Li Shaolin, Tel: 86-23-68485060, E-mail: shaolinli202@sina.com

我国肺癌的发病率和死亡率占常见恶性肿瘤的首位。尤其是非小细胞肺癌患者(non small cell lung cancer,NSCLC),大多在确诊时已属于晚期,失去手术根治机会。放疗为晚期NSCLC治疗的主要手段之一,但临床上多数晚期非小细胞肺癌患者放射治疗效果欠佳。如何提高放射治疗的疗效,成为肺癌治疗中备受关注的问题。5,7,4'-三羟基异黄酮(Genistein)是多酚类化合物中的一种特殊类型,是大豆异黄酮的主要成分,具有抗肿瘤、降低心血管疾病发生率等生物学作用。国外研究表明与放疗联合可增加肝细胞癌、食管癌、前列腺癌和宫颈癌的放疗敏感性[1-5]。脱嘌呤/脱嘧啶核酸内切酶/氧化还原因子(apurinic/aprimidinic endonuclease/redox factor-1,APE1/Ref-1)是一个多功能蛋白,具有氧化还原和DNA损伤修复功能。本研究通过观察Genistein联合放疗对人肺腺癌细胞A549增殖凋亡及其Ape1/Ref1蛋白的影响,从而探讨其可能的机制。

1 材料与方法

1.1 材料和仪器

人肺腺癌细胞A549购买于中科院上海细胞库,Genistein和MTT试剂盒为Sigma公司产品。Western blot试剂盒为碧云天公司产品。8MV直线加速器(Precise全数字化直线加速器,EL EKTA公司)。

1.2 细胞培养

将A549培养于含10%胎牛血清、100 U/ml青霉素、100 U/ml链霉素的DMEM培养基中,37 ℃、5% CO_2混合气体培养箱中培养。常规消化传代,取对数生长期细胞进行实验。

1.3 细胞增殖的测定(MTT法)

收集对数生长期的细胞,以每孔1×10^4个细胞接种于96孔培养板,培养12 h后离心10 min、弃上清,每孔加入含不同浓度药物的培养基150 μl。一组使Genistein终浓度为10、30、60、90 μmol/L,每一药物浓度设5个复孔,对照组加入等量不含药物的培养基培养48 h。另一组同样使Genistein终浓度为0、10、30、60、90 μmol/L培养24 h后应用8 MV直线加速器,射野10 cm×10 cm,剂量率400 cGy/min,单次照射8 Gy。继续予以培养箱中培养24 h,两组加入MTT(5 mg/ml)20 μl,培养4 h后离心、加入DMSO 200 μl振荡10 min,全自动酶标仪测吸光度值[D(490)]。按照以下公式计算增殖抑制率。增殖抑制率=(对照组吸光度值-实验组吸光度值)/对照组吸光度值×100%。重复上述实验3次。

1.4 细胞生长存活数检测

将对数生长期A549细胞以1×10^4/ml的密度接种于24孔培养板,分为对照组、单纯放疗组、单纯Genistein组、Genistein+IR组,每组5个复孔,待细胞贴壁后对单纯GEN组和Genistein+IR组分别加入终浓度为30 μmol/L的Geinstein,第1~6天后分别计数,计数时用0.25%胰酶消化细胞,锥虫蓝染色,于倒置显微镜下计数活细胞,每次计数重复3次。其中在第1天计数后给予IR组、Genistein+IR组直线加速器照射8 Gy。

1.5 流式细胞术检测细胞周期

取对数生长期细胞分别接种于5 ml培养皿中,分为对照组、单纯放疗组、单纯Genistein组、Genistein+IR组,培养12 h待细胞贴壁后弃去旧培养基,加入无血清DMEM培养基,单纯GEN组和Genistein+IR组分别加入终浓度为30 μmol/L的Geinstein,24 h后单纯IR组和Genistein+IR组用直线加速器照射8 Gy,继续培养24 h后,PBS洗2遍细胞,胰酶消化,收集细胞,PBS洗1遍;用70%乙醇固定,使细胞浓度达1×10^6/ml。PI染色,流式细胞仪监测。重复上述实验3次。

1.6 Western blot检测APE1/Ref1蛋白

用Western blot方法检测对照组、单纯放疗组(8 Gy)、单纯Genistein组(GEN 30 μmol/L)、Genistein+IR组(GEN 30 μmol/L+8 Gy)的A549细胞APE1/Ref1蛋白表达。兔抗人APE1/Ref1多克隆抗体(1∶2 000,由本实验室自行制备),兔抗人β-actin单克隆抗体(1∶2 000,Pierce公司),HRP标记的羊抗兔二抗(1∶2 000,Pierce公司),化学发光试剂盒(Pierce公司)。

1.7 统计学处理

数据用SPSS 17.0软件进行单因素方差分析和t检验。

2 结果

2.1 Genistein单独及联合放疗对A549细胞增殖抑制的情况

Genistein单独使用及联合放疗对A549细胞增殖抑制率均呈现剂量依赖性,随着剂量增大抑制率增加,且Genistein联合放疗比单纯放疗细胞增殖抑制率高,但低浓度10 μmol/L联合放疗的增殖抑制率与单纯放疗比无显著统计学差异,随着Gensitein浓度增高到30 μmol/L时与单纯放疗比呈现显著性差异,故认为30 μmol/L为最适宜的作用浓度。结果见表1。

表1 不同浓度Genistein单独及联合放疗A549细胞的增殖抑制率($n=5$,$\bar{x}\pm s$)

处理因素	增殖抑制率(%)	处理因素	增殖抑制率(%)
对照组	0	IR	24.70±0.72
10 μmol/L	10.95±0.17[a]	IR+10 μmol/L	26.67±1.26
30 μmol/L	19.08±0.56[a]	IR+30 μmol/L	39.66±1.22[b]
60 μmol/L	36.82±2.95[a]	IR+60 μmol/L	48.98±0.92[b]
90 μmol/L	46.05±1.70[a]	IR+90 μmol/L	56.51±2.12[b]

a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与单纯放疗组比较

2.2 细胞生长曲线

用GEN和放疗IR处理后观察A549细胞生长情况见图1。用30 μmol/L GEN预处理细胞1 d后计数继之用8 Gy X线照射单纯放疗组和Genistein+IR组,再分别计数各组第2~6天的存活细胞数量。用或不用30 μmol/L GEN预处理细胞1 d后

计数,再联合或不联合 8 Gy X 线照射,分别计数各组第 2 ~ 6 天的活细胞数量。30 μmol/L GEN 联合放疗组明显抑制 A549 细胞生长。

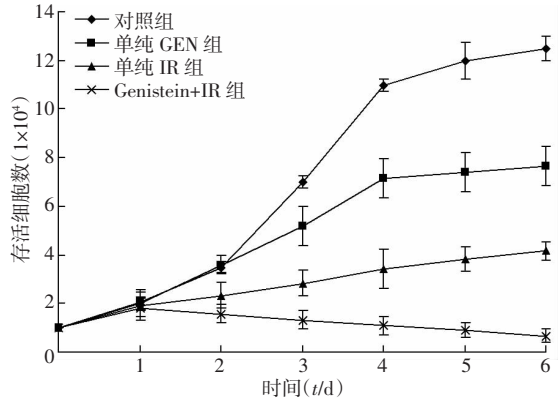
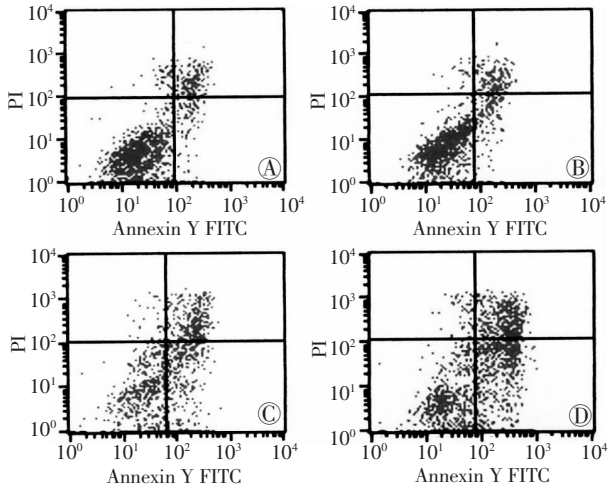


图 1 用 GEN 和 IR 处理 A549 细胞后的生长曲线

2.3 Genistein 单独及联合放疗对 A549 细胞凋亡的影响

IR 组、Genistein + IR 组早期凋亡率分别为(30.88 ± 7.63)%、(42.98 ± 1.46)%,与对照组(6.80 ± 0.98)%比较,均显著增加($P < 0.05$)。而单纯 GEN 组早期凋亡率为(12.96 ± 4.99)%,较对照组有所增加,但无明显统计学差异($P = 0.143$)。流式细胞仪检测结果见图 2。

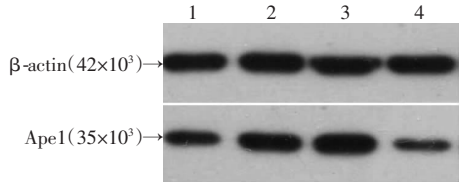


A:对照组;B:单纯 Genistein 组;C:单纯放疗组;D:Genistein + IR 组

图 2 流式细胞仪测定各处理组 A549 的早期凋亡率

2.4 APE1/ Ref1 蛋白变化

由图 3 看出放疗组 Ape1 蛋白表达量最高,其次为对照组,再次为单纯 GEN 组,而 Genistein + IR 组表达量最低。



1:单纯 Genistein 组;2:对照组;3:单纯放疗组;4:Genistein + IR 组

图 3 Westernblot 法检测 Ape1 蛋白的表达水平

3 讨论

晚期 NSCLC 经过标准治疗后,50% ~60% 的患者面临复发,如何提高局部控制率,减少复发率成为临床上亟待解决的问题。近年流行病学调查发现东南亚国家的乳腺癌、前列腺癌发生率相对西方国家较低,可能与其国民摄入含异黄酮丰富的食物有关。Genistein 结构和分子量与雌二醇相似,能增加放疗和细胞毒类化疗药物的敏感性[6]。由于其基本上无不良反应,还可能发挥抗氧化剂作用,减轻放疗后肿瘤患者正常组织的副反应[7],为肿瘤治疗提供了一个新的途径。本实验通过 MTT 法得出 Genistein 对 A549 细胞的增殖抑制作用呈现剂量依赖性,应用流式细胞仪检测细胞凋亡进一步证实 30 μmol/L 的 Genistein 和放疗联合应用比单纯放疗 8 Gy 及单纯 30 μmol/L GEN 更能有效地抑制肿瘤细胞增殖,促进其早期凋亡。

细胞受到照射后,DNA 分子将产生多种类型的损伤,从而引起细胞凋亡和死亡。研究发现碱基损伤为放疗后的主要损伤之一,放疗所致的氧化应激一旦发生将刺激高度保守的损伤修复过程以保证基因组完整性,其中碱基切除修复(BER)为放疗损伤修复主要途径之一。Ape/Ref1 是一个多功能蛋白,具有氧化还原和 DNA 损伤修复功能,在碱基切除修复中作为脱嘌呤/脱嘧啶核酸内切酶起着重要的作用,能维持基因组完整性和调节某些基因的表达[8-9]。放疗后肿瘤细胞启动其修复途径意味着放疗抵抗和肿瘤细胞存活,临床上即出现局部复发或治疗失败。大量研究表明 Ape/Ref1 蛋白表达增加将促使肿瘤细胞对放化疗抵抗[10-12],而降低其表达致使肿瘤细胞对各种 DNA 损伤包括放疗敏感性增加[13-14]。Raffoul 等[15]通过体内外实验研究表明,放射治疗将上调细胞表达 Ape1/Ref-1,而给予三羟基异黄酮预处理,将降低放疗后 Ape1/Ref-1 表达。最新研究发现大豆异黄酮可能是通过抑制 APE1/Ref-1 的 DNA 修复功能达到杀伤肿瘤细胞[16]。这与本实验采用 Western blot 法检测各组细胞中 Ape1/Ref1 蛋白表达结果一致,单纯放疗组 Ape1/Ref1 蛋白表达明显高于 Genistein + IR 组,故可以认为给予 Genistein 预处理 A549 细胞后降低了放疗所致的 Ape1/Ref1 蛋白升高,从而影响肿瘤细胞的 DNA 损伤修复途径,继而影响肿瘤细胞的生长和表达。

总之,30 μmol/L 的 Genistein 可增加放疗对 A549 细胞的增殖抑制作用,其机制之一可能是通过减少 Ape1/Ref1 蛋白的表达来实现的。随着分子生物学研究的进一步发展,Genistein 增加放疗敏感性的更多分子机制将被逐一揭开。这必将会为临床治疗晚期非小细胞肺癌提供一条新的、有效的治疗途径,并在提高癌症患者的生存质量方面做出更大的贡献。

参考文献：

[1] Akimoto T, Nonaka T, Ishikawa H, *et al*. Genistein, a tyrosine kinase inhibitor, enhanced radiosensitivity in human esophageal cancer cell lines *in vitro*: possible involvement of inhibition of survival signal transduction pathways[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2001, 50(1): 195 – 201.

[2] Yan S X, Ejima Y, Sasaki R, *et al*. Combination of genistein with ionizing radiation on androgen-independent prostate cancer cells [J]. Asian J Androl, 2004, 6(4): 285 – 290.

[3] Yashar C M, Spanos W J, Taylor D D, *et al*. Potentiation of the radiation effect with genistein in cervical cancer cells[J]. Gynecol Oncol, 2005, 99(1): 199 – 205.

[4] Zhang B, Liu J Y, Pan J S, *et al*. Combined treatment of ionizing radiation with genistein on cervical cancer HeLa cells[J]. J Pharmacol Sci, 2006, 102(1): 129 – 135.

[5] Hillman G G, Singh-Gupta V. Soy isoflavones sensitize cancer cells to radiotherapy[J]. Free Radic Biol Med, 2011,51(2): 289 – 298.

[6] Banerjee S, Li Y, Wang Z, *et al*. Multi-targeted therapy of cancer by genistein[J]. Cancer Lett, 2008, 269(2): 226 – 242.

[7] Singh-Gupta V, Zhang H, Yunker C K, *et al*. Daidzein effect on hormone refractory prostate cancer *in vitro* and *in vivo* compared to genistein and soy extract: potentiation of radiotherapy[J]. Pharm Res, 2010, 27(6): 1115 – 1127.

[8] Nishi T, Shimizu N, Hiramoto M, *et al*. Spatial redox regulation of a critical cysteine residue of NF-kappa B *in vivo*[J]. J Biol Chem, 2002, 277(46): 44548 – 44556.

[9] Guan Z, Basi D, Li Q, *et al*. Loss of redox factor 1 decreases NF-kappaB activity and increases susceptibility of endothelial cells to apoptosis[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005, 25(1): 96 – 101.

[10] Naidu M D, Mason J M, Pica R V, *et al*. Radiation resistance in glioma cells determined by DNA damage repair activity of Ape1/Ref-1 [J]. J Radiat Res (Tokyo), 2010, 51(4): 393 – 404.

[11] Robertson K A, Bullock H A, Xu Y, *et al*. Altered expression of Ape1/ref-1 in germ cell tumors and over expression in NT2 cells confers resistance to bleomycin and radiation[J]. Cancer Res, 2001, 61(5): 2220 – 2225.

[12] Freitas S, Moore D H, Michael H, *et al*. Studies of apurinic/apyrimidinic endonuclease/ref-1 expression in epithelial ovarian cancer: correlations with tumor progression and platinum resistance[J]. Clin Cancer Res 2003, 9(13): 4689 – 4694.

[13] Fishel ML, Jiang Y, Rajeshkumar NV, *et al*. Impact of APE1/Ref-1 Redox Inhibition on Pancreatic Tumor Growth[J]. Mol Cancer Ther, 2011, Jun 23. [Epub ahead of print].

[14] Wang D, Luo M, Kelley M R. Human apurinic endonuclease 1 (APE1) expression and prognostic significance in osteosarcoma: enhanced sensitivity of osteosarcoma to DNA damaging agents using silencing RNA APE1 expression inhibition[J]. Mol Cancer Ther, 2004, 3(6): 679 – 686.

[15] Raffoul J J, Banerjee S, Singh-Gupta V, *et al*. Down-regulation of apurinic/apyrimidinic endonuclease 1/redox factor-1 expression by soy isoflavones enhances prostate cancer radiotherapy *in vitro* and *in vivo*[J]. Cancer Res, 2007, 67(5): 2141 – 2149.

[16] Singh-Gupta V, Joiner M C, Runyan L, *et al*. Soy isoflavones augment radiation effect by inhibiting APE1/Ref-1 DNA repair activity in non-small cell lung cancer[J]. J Thorac Oncol, 2011, 6(4): 688 – 698.

（**收稿**:2011-04-03;**修回**:2011-07-13）

（编辑 汪勤俭）

（上接 2007 页）

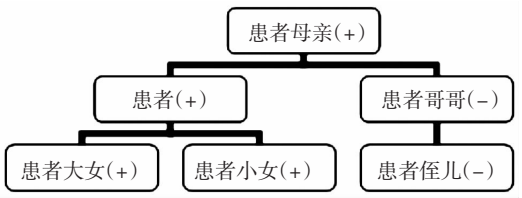


图 2 May-Hegglin 异常患者家族成员 May-Hegglin 异常显示

2 讨论

May-Hegglin 异常(May-Hegglin anomaly,MHA)是一种少见的常染色体显性遗传性疾病,常有血小板减少、巨大血小板和粒细胞包涵体等三联征表现。在粒细胞胞质中找到 May-Hegglin 包涵体,在家庭成员中有类似的发现,结合临床病史作出诊断并不难[2];目前检测粒细胞包涵体的方法,主要是采用血涂片瑞氏-吉姆萨染色后光学显微镜下直接镜检、透射电镜和间接免疫荧光等方法;Naris 等在光镜下观察外周血白细胞包涵体描述其形态为 2 ~ 4 μm 大小,多呈纺锤形、杆状、长条形或新月牙形,多数包涵体靠粒细胞的周边分布,粒细胞质中大多含 1 个,少数可含 2 ~ 3 个。通过对患者及家族成员血细胞形态的追踪观察,其结果与上述描述相符合,结合临床资料,考虑为家族性 MHA 遗传病。

MHA 在临床上极易误诊和漏诊,主要原因是粒细胞胞质中的包涵体易被忽略,在某些情况下由于染色原因使其包涵体着色较淡,如检验人员粗心大意,极易造成漏诊;另因 MHA 是一种罕见疾病,也有部分工作人员错把 MHA 误认为感染引起的杜勒氏小体;杜勒氏小体,体积较小,常呈圆形界限不清的云雾状;而 MHA 包涵体则较清晰,界限清楚并相对有形。在感染有杜勒小体形成时常常伴有中毒颗粒、空泡变性、核固缩等中毒表现,一般没有巨大血小板的出现,当感染得到控制后小体就会消失。但 MHA 患者的蓝斑小体为终生存在[3]。

此病例自 2008 年 2 月至 2009 年 4 月间,几度进出多家医院。原本行血常规涂片检查就能发现的病例,多次被遗漏,最终在特殊的骨髓穿刺检查中才得以发现。提醒我们:细胞形态学诊断仍是临床血液学疾病诊断的基础,应该重视血细胞形态学检查以及对罕见病例的认识。

参考文献：

[1] 吴兴福, 朱红楠. 血液细胞形态学检验中应注意的问题[J]. 临床检验杂志, 2010, 28(5): 396 – 397.

[2] 张广森, 易彦, 徐敏, 等. 一个 May-Hegglin 异常家系非肌性肌球蛋白重链 9 基因突变位点的鉴定[J]. 中华医学杂志, 2002, 82(13): 918 – 920.

[3] 郝冀洪, 朱芸. 遗传性 May-Hegglin 异常的实验室检查[J]. 中华检验医学杂志, 2008, 31(6): 708 – 709.

（**收稿**:2011-04-03;**修回**:2011-05-02）

（编辑 邓强庭）